

明細書

BEST AVAILABLE COPY

DNA 配列の塩基変換方法

5

技術分野

この出願の発明は、DNA 配列の塩基変換方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、細胞内の標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基または塩基配列を他の塩基または塩基配列に変換する方法に関するものである。

10

背景技術

近年のヒトゲノム計画の進展や大量遺伝子サンプルのスクリーニング方法の開発によって、個人の遺伝子情報がより詳細かつ簡便に調べることが可能になった（文献 1、2）。このような技術の進歩と共に、個々の患者の遺伝子情報に合わせて、変異の入った配列を直接正常な配列に戻す遺伝子修復法は、遺伝子治療におけるテラーメード医療として、非常に期待できる技術である。この遺伝子修復法の一つである Small Fragment Homologous Replacement (SFHR) 法は、正常遺伝子配列を含む、熱変性させた PCR 産物（二本鎖 DNA 断片）を細胞へ導入することによって、変異遺伝子を正常型へ変換することを目的としている（文献 3～5）。これまでこの方法によって、囊胞性線維症や筋ジストロフィーなどの原因遺伝子を修復できることが報告してきた（文献 6、7）。このように修復された遺伝子は、正常遺伝子と同様に本来のプロモーターの制御下で、細胞内で適切に発現されることが期待できる。また、これまでの遺伝子治療では難しいとされてきた癌遺伝子に代表されるような機能獲得性変異も、原理的に治療・修復することが可能である。

また、一本鎖 DNA 断片を用いる遺伝子修復方法としては、化学合成により得られた末端修飾オリゴヌクレオチドを用いた方法が知られている。これは、両末端をホスホチオエート（文献 8～10）や 2'-O-Me-RNA（文献 11～13）、さらには LNA (Locked nucleic acid)（文献 14）で修飾した 25～100 塩基の一本鎖

DNA を用いて、哺乳動物細胞と酵母においてそれぞれ 10^{-2} 、 10^{-5} の修復効率を示すことが報告されている。またこの末端修飾オリゴヌクレオチドを用いた方法では、標的 DNA 配列のアンチセンス鎖と相同の一一本鎖 DNA 断片を用いたときに、より高い遺伝子修復効率を示すことが知られている（文献 8、11）。

- 5 前記のとおり、SFHR 法は新しい遺伝子治療の形態として極めて有望である。しかしながら、現在のところ SFHR 法における変異遺伝子の修復効率は、用いているアッセイ系や標的遺伝子により大きくばらついているものの、多くは 1 %未満にとどまり、この値を飛躍的に向上させることができ、SFHR 法を臨床応用可能な技術とするためには不可欠である。
- 10 そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、相補鎖から分離することなく、遺伝子修復用の一一本鎖 DNA 断片を調製でき、また、この一本鎖 DNA 断片を利用して、細胞内 DNA 配列の塩基をより効率良く変換することのできる方法を提供することを課題としている。

15

文献

文献 1 : Joos L, Eryusel E and Brutsche MH. Functional genomics and gene microarrays—the use in research and clinical medicine. Swiss Med Wkly. 2003;133:31-38.

文献 2 : Ferrari M, Stenirri S, Bonini P, Cremonesi L. Molecular diagnostics 20 microelectronic microchips. Clin Chem Lab Med. 2003;41:462-467.

文献 3 : Kunzelmann K, Legendre J-Y, Knoell DL, Escobar LC, Xu Z and Gruenert DC. Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. Gene Ther. 1996;3:859-867.

文献 4 : Goncz KK, Kunzelmann K, Xu Z and Gruenert DC. Targeted replacement 25 of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. Hum Mol Genet. 1998;7:1913-1919.

文献 5 : Colosimo A, Goncz KK, Novelli G, Dallapiccola B and Gruenert DC. Targeted correction of a defective selectable marker gene in human

epithelial cells by small DNA fragments. Mol Ther. 2001;3:178-185.

文献6 : Goncz KK, Colosimo A, Dallapiccola B, Gagne L, Hong K, Novelli G, Papahadjopoulos D, Sawa T, Schreier H, Weiner-Kronish J, Xu Z and Gruenert DC. Expression of delta-F508 CFTR in normal mouse lung after site-specific
5 modification of CFTR sequences by SFHR. Gene Ther. 2001;8:961-965.

文献7 : Kapsa R, Quigley A, Lynch GS, Steeper K, Kornberg AJ Gregorevic P, Austin L and Byrne E, In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. Hum Gene Ther. 2001;12:629-642.

10 文献8 : Liu L, Rice MC, Drury M, Cheng S, Gamper H and Kmiec EB. Strand bias in targeted gene repair is influenced by transcriptional activity. Mol Cell Biol. 2002;22:3852-3863.

文献9 : Lin L, Cheng S, van Brabant AJ and Kmiec EB. Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by
15 modified single-stranded oligonucleotide vectors. Nuclic Acids Res. 2002;30:2742-2750.

文献10 : Brachman EE and Kmiec EB. Targeted nucleotide repair of cycl mutations in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded nucleotides. Genetics. 2003;163;527-538.

20 文献11 : Igoucheva O, Alexeev V and Yoon K. Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. Gene Ther. 2001;8:391-399.

文献12 : Alexeev V, Igoucheva O and Yoon K. Simultaneous targeted alteration of the tyrosinase and c-kit genes by single-stranded
25 oligonucleotides. Gene Ther. 2002;9:1667-1675.

文献13 : Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL and Yoon K. Oligonucleotide-directed single base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. Gene Ther. 2003;10:24-33.

文献 14 : Parekh-Olmedo H, Drury M and Kmiec EB. Targeted nucleotide exchange in *Saccharomyces cerevisiae* directed by short oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Chem Biol.* 2002;9:1073-1084

5

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するための第 1 の発明は、細胞内の標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基を変換する方法であって、標的 DNA 配列と相同であり、かつ、変換すべき塩基を含む、一本鎖環状 DNA から調製される 300~3,000 塩基の一本鎖 DNA 断片を細胞内に導入することを特徴とする DNA 配列の塩基変換方法 10 である。

この第 1 発明においては、一本鎖 DNA 断片が、標的 DNA 配列のセンス鎖と相同であることを好ましい態様としている。

また、この第 1 発明における一つの実施態様は、一本鎖環状 DNA が、ファージミド DNA であることであり、また、その 1 または複数個の塩基変異によって疾患 15 の原因となっている標的 DNA 配列を塩基変換することである。

さらに第 1 発明における別の実施態様は、生物体内細胞の標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基を変換することである。

この出願の第 2 の発明は、前記発明第 1 発明の方法によって、標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基が変換された細胞である。

20 この出願の第 3 の発明は、前記第 2 発明の細胞を体内に保有する生物個体である。

この出願の第 4 の発明は、標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基変異が原因となっている疾患を治療するための薬剤であって、標的 DNA 配列に相補的であり、かつ、変換すべき塩基を含む、一本鎖環状 DNA から調製される 300~3,000 塩基 25 の一本鎖 DNA 断片が細胞内に導入可能な形態を有する治療薬剤である。

この第 4 発明における一つの実施態様は、一本鎖環状 DNA が、ファージミド DNA であることであることである。

この出願の第 5 の発明は、標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基変異が原因と

なっている疾患を治療する方法であって、標的 DNA 配列に相補的であり、かつ、変換すべき塩基を含む、一本鎖環状 DNA から調製される 300～3,000 塩基の一本鎖 DNA 断片を細胞内に導入することを特徴とする治療方法である。また、第 5 発明における一つの実施態様は、一本鎖環状 DNA が、ファージミド DNA であること 5 であることである。

なお、この発明において「DNA 配列」とはプリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) が結合した分子を意味する。

また、「変換」とは、標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基 (A、T、C、G) が 10 それぞれ他の塩基に置き換わること (塩基置換)、標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基が欠失すること (塩基欠失)、標的 DNA 配列に 1 または複数個の塩基が付加されること (塩基付加) を意味する。さらに、これらの塩基変換は、標的 DNA 配列の個々に独立した 1 または複数個の塩基が対象であってもよく、あるいは標的配列中の複数個の塩基からなる配列の置換、欠失および付加 (それぞれ配列置 15 換、配列欠失、配列付加：以下これらを「配列変換」と記載することがある) であってもよい。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば 20 容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990、Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New 25 York, N.Y., 1995 等に記載されている。さらに、この発明における用語は基本的には IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

上記のとおりのこの出願の前記発明によれば、目的とする遺伝子修復用の一本

鎖 DNA 断片は、相補鎖を持たない一本鎖環状 DNA から調製されるため、目的の一本鎖 DNA 断片を相補鎖から分離操作する必要がなく、しかも従来の SFHR 法に比較して、高い効率で標的 DNA 配列の塩基または塩基配列を正確に変換することが可能となる。特に標的 DNA 配列のセンス鎖に相同の一本鎖 DNA 断片を使用することによって、効率よく標的遺伝子の目的塩基を正確に変換することが可能となる。

図面の簡単な説明

図 1 A は、正常型および変異型の HygEGFP 遺伝子をそれぞれ組み込んだ標的プラスミド pTENHES および pTENHEX の構成図である。図 1 B は、一本鎖のアンチセンス DNA 断片およびセンス DNA 断片を作成するためのファージミドベクター pBSHES/AntiSense および pBSHES/Sense の構成図である。

図 2 は、標的プラスミド pTENHEX と一本鎖センス DNA 断片を哺乳動物細胞 (CHO-K1 細胞) に導入した場合の蛍光シグナルを観察した顕微鏡写真像である。変異型 HygEGFP 遺伝子が一本鎖 DNA 断片によって修復され、EGFP 遺伝子が発現して蛍光シグナルが生じる。

図 3 は、標的プラスミド pTENHEX と一本鎖 DNA 断片 (fAntiS, f Sense)、二本鎖 DNA 断片 (dsHES) および PCR 産物 (pcrHES) を導入した哺乳動物細胞 (CHO-K1 細胞) から回収したプラスミド DNA を大腸菌に導入し、ハイグロマイシン B 添加寒天培地で培養した状態をイメージアナライザで解析した像である。特に一本鎖センス DNA 断片 (fSense) を導入した場合に、変異型 HygEGFP 遺伝子が修復され、細胞はハイグロマイシン B 耐性および蛍光シグナル陽性形質を獲得する。

図 4 は、dsHES、fAntiS、f Sense および pcrHES のそれぞれの細胞導入量における遺伝子修復効率を示したグラフ図である。

図 5 は、EGFP 陽性細胞から抽出した標的プラスミドより増幅した PCR 産物の制限酵素 PmaCI 断片の電気泳動の結果を示した。

図 6 は、EGFP 陽性細胞から抽出した標的プラスミドの配列分析の結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について詳しく説明する。

第1発明の方法は、標的DNA配列と相同であり、かつ、変換すべき塩基を含む、
5 一本鎖環状DNAから調製される300～3,000塩基の一本鎖DNA断片を細胞内に導入することによって、標的DNA配列の1または複数個の塩基を変換することを特徴としている。すなわちこの方法は、標的DNA配列またはその一部領域を一本鎖DNA断片により「相同置換(homologous replacement)」することによって、標的DNA配列内の変換しようとする塩基または塩基配列(以下「標的塩基」と記載する)を、別の塩基または塩基配列(以下「変換塩基」と記載する)に変換することを原理としている。そして、従来のSFHR法が二本鎖DNA断片(例えばPCR産物)を熱変性してそれぞれ一本鎖DNA断片とし、センス鎖とアンチセンス鎖の両方を標的DNA配列に作用させるのに対し、この発明の方法は、一本鎖DNA断片のみ(センス鎖またはアンチセンス鎖、好ましくはセンス鎖)を標的DNA配列に作用させることを特徴としている。
10
15

「一本鎖DNA断片」は、変換塩基を含むことを除き、標的DNA配列と相同である。この場合の「相同」とは、二本鎖の標的DNA配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖のいずれか一方と95%以上、好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、そして理想的には100%同一の配列であることを意味するが、標的DNA配列のセンス鎖と相同であることが、変換効率の点から好ましい。
20

またこの一本鎖DNA断片は、その端部が非修飾である。すなわち、前記の修飾オリゴヌクレオチドのように、両末端がホスホロチオエート、2'-O-Me-RNA、LNA(Locked nucleic acid)で修飾されていないDNA断片である。

「一本鎖DNA断片のサイズ」は、標的DNA配列の長さや標的塩基の数等に応じて、300～3,000塩基の範囲から選択される。例えば、300～500塩基長、500～800塩基長、800～1200塩基長、1200～1700塩基長、1700～2300塩基長、2300～3000塩基長といったDNA断片である。

「標的DNA配列」は、細胞内に存在するDNA配列であれば特に限定されるもの

ではなく、ゲノム遺伝子の DNA 配列、ミトコンドリアの DNA 配列、プラスミドの DNA 配列など、細胞内において何らかの機能を担う DNA 配列を対象とすることができる。

一本鎖 DNA 断片における「変換塩基」の数は、標的 DNA 配列における標的塩基の数に依存する。例えば個々の塩基変換（塩基置換、塩基欠失、塩基付加）の場合には、標的 DNA 配列や一本鎖 DNA 断片のサイズに応じて、1 または複数個（2 ~ 30 個程度）とすることができますが、効率良く置換するためには、1 ~ 10 程度が好ましい。また、配列変換の場合には、2 ~ 30 程度、好ましくは 2 ~ 10 程度の塩基からなる配列を変換塩基とする。また一本鎖 DNA 断片における変換塩基の位置には特段の制限はないが、DNA 断片の末端部ではないことが好ましい。

一本鎖 DNA 断片は、例えば以下のように作成することができる。例えば、標的 DNA 配列が、塩基変異を有する配列（例えば疾患原因となっているゲノム遺伝子 DNA 配列）である場合、1 本鎖 DNA 断片は、例えば正常なゲノム遺伝子 DNA 配列やその cDNA を適当な一本鎖 DNA ベクター（例えば、ファージミド DNA 等）で増幅し、酵素等により断片化して、目的の部分と不要の部分とに分離・精製して作成することが好ましい。このような調製によって、相補鎖と分離する必要もなく、また、短鎖および長鎖にかかわらず一本鎖 DNA 断片を得ることができる。

なお、DNA 断片を調製する方法としては、試験管内で鑄型 DNA を増幅する方法 [例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法等] が知られているが、これらの方法の場合には、鑄型 DNA と高度に一致する一本鎖 DNA 断片を増幅することが困難である。例えば PCR 法の場合には、数百塩基に一回の確率で変異が導入されることが知られている (Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami H, Oka M and Imanaka T. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR, Appl Environ Microbiol. 1997;63:4504-4510)。このような一本鎖 DNA 断片における「予想外の変異」は、例えば疾患遺伝子の修復に使用した場合、正常な塩基に新たな変異を導入する危険性があり、好ましくない。ま

た、大腸菌プラスミドの場合には、PCR 法よりも約 10^8 倍の正確さでそのインサート（二本鎖 DNA 断片）を増幅することができる (Drake JW. Comparative rates of spontaneous mutation. Nature. 1969;221:1132 参照) が、増幅した二本鎖 DNA 断片を変性させて一本鎖 DNA 断片とした場合、センス鎖とアンチセンス鎖を 5 分離することが困難である。従って、特にセンス一本鎖 DNA 断片を標的 DNA 配列に作用させる場合には、プラスミド DNA による一本鎖 DNA 断片の作成は好ましくない（このような不都合は、PCR 産物（二本鎖 DNA 断片）から一本鎖 DNA 断片を作成する場合も同様である）。

一方、細胞内の正常ゲノム遺伝子配列に変異を導入することによって、非天然 10 型の細胞や動物個体（これらの細胞や動物個体は、例えば特定の化合物等に対する感受性が正常型とは異なることによって化合物スクリーニング系として有用であり、あるいは疾患モデル細胞または疾患モデル動物等として有用である）を作出するためにも、この発明の方法を使用することができる。このような正常な標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基を変換するための（すなわち、人為的な変 15 異導入のための）1 本鎖 DNA 断片は、市販の変異導入キット等を用いた方法や、変異導入型の PCR 法等の公知の方法により作成した、一本鎖環状 DNA（たとえば、ファージミド DNA 等）から調製することができる。

上記のような、一本鎖環状 DNA から調製される一本鎖 DNA 断片を細胞内に導入するには、リン酸カルシウム法、リポソームや赤血球ゴーストを使用する方法、 20 エレクトロポレーション法、ガラスピベットを用いた微量注入法等の公知の手法を用いることができる。

また、一本鎖 DNA 断片は、生物体内に存在する細胞内に導入することができる。その場合には、適当な溶媒と混合した状態で一本鎖 DNA 断片を生物体内に投与する方法を採用することができる。あるいは生体認識分子を提示した中空ナノ粒子 25 やリポソーム等に一本鎖 DNA 断片を包埋して生物体内に導入するようにしてもよい。また、エレクトロポレーション法を採用することもできる。

そして、この生物体内に存在する細胞内に一本鎖 DNA 断片を導入する方法は、対象となる標的 DNA 配列が、その 1 または複数個の塩基変換変異によって疾患の

原因となっているような「疾患原因遺伝子」の場合には、その原因遺伝子の塩基変換変異を修正することが可能となる（第5発明）。また、そのような一本鎖DNA断片を、前記のとおりに「細胞内に導入可能な形態」とすることによって、遺伝子の塩基変換変異を原因とする疾患の治療薬剤となる（第4発明）。

- 5 なお、遺伝子疾患の原因として知られている変異には、一塩基の変換だけではなく、ハンチントン舞踏病に見られるような CAG リピートによる長鎖挿入変異 (McMurray CT. Huntington's disease: new hope for therapeutics. Trends Neurosci. 2001;24:S32-S38) や、筋ジストロフィーのジストロフィン遺伝子における長鎖欠失変異 (Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burns 10 J and Davies KE. Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. Nature. 1987;329:638-640. 19. Den Dunnen JT, Bakker E, Breteler EG, Pearson PL and van-Ommen GJ. Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. Nature. 1987;329:640-642) のように、修復用一本鎖DNAに正確かつ長い塩基配列を必要とするような原因遺伝子も存在する。このような変異遺伝子に対しても、この発明の治療方法および治療薬剤は有効である。

- この出願の第2の発明は、前記第1発明の方法によって、標的DNA配列の1または複数個の塩基若しくは塩基配列が他の塩基または塩基配列に変換された「細胞」である。細胞の種類には特段の制限はなく、大腸菌、枯草菌等の原核細胞、20 酵母、昆虫細胞、動植物細胞等の真核細胞等を対象とすることができる。このように作成された細胞は、例えば、その機能遺伝子配列に1または複数個の塩基変換が導入された細胞であり、特定の機能が欠損または亢進した細胞として、例えば薬剤や生理活性物質、細胞毒性物質等の *in vitro* スクリーニングの材料として使用することができる。また、バイオリアクターや発酵工学等において使用する細胞について、その用途において「不都合」な特定の細胞機能を欠損させるためにも使用することができる。

この出願の第3の発明は、前記第2発明の細胞を体内に保有する生物個体であり、特に動植物細胞等の多細胞生物である。また、この生物個体は、前記第2発

明の細胞（*in vitro* で塩基変換された細胞）を体内に移植された生物個体であつてもよく、あるいは一本鎖 DNA 断片を体内に導入された結果、体内細胞の標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基が他の塩基または塩基配列に変換された生物個体であってもよい。このような生物個体は、例えば、その標的 DNA 配列の塩基置換 5 が疾患の原因となる場合には、「疾患モデル動物」として有用である。また、様々な遺伝子を塩基変換し、薬剤成分や毒性物質を *in vivo* スクリーニングする等の用途にも使用することができる。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細、かつ、具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

10

実施例

この実施例では、哺乳動物細胞および大腸菌のプロモータ下流に、ハイグロマイシン耐性遺伝子（Hyg）と緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子の融合遺伝子（HygEGFP）を導入したプラスミドを構築し、一本鎖 DNA 断片による塩基置換を 15 検討した。すなわち、標的プラスミドである pTENHEX は、HygEGFP 遺伝子のコドン 34 に終止変異（Stop: TGA）が導入されているため、哺乳動物細胞および大腸菌内で正常な HygEGFP 遺伝子を発現することができない。そこで、コドン 34 が正常型の Ser (TCA) である一本鎖 DNA 断片（HygEGFP 遺伝子）を細胞に導入することによって、この変異 HygEGFP 遺伝子のコドン 34 を正常型の Ser (TCA) に修復するか否かを、ハイグロマイシン耐性および EGFP の蛍光発色という 2 種類の表現型によって確認した。

これまでの研究において、相同な配列を持つ二組の DNA が相互作用する際、一方の二本鎖が一本鎖になることによって、他方の二本鎖へ進入することが知られている（Kowalczykowski SC. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trend Biochem Sci.* 2000;25:156-165 ; Baumann P, Bensen FE and West SC. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions *in vitro*. *Cell.* 1996;87:757-766.）。そこで、SFHR 法の機構にこれと類似した仕組みが存在する

ならば、二本鎖 DNA を使うよりも、あらかじめ一本鎖 DNA を調製して遺伝子修復を行えば、より高い遺伝子修復効率が得られることが想定される。そこで、ファージミド DNA を用いて環状一本鎖 DNA を調製し、これを制限酵素で切り出して一本鎖 DNA 断片としたもの (fSense, fAntiS) を使用した。

5 なお、比較に用いる二本鎖 DNA 断片は、PCR 法よりも 10⁸ 倍の正確さを持つ大腸菌内 (Drake JW. Nature. 1969;221:1132 9) で複製されたプラスミドより、制限酵素を用いて二本鎖 DNA 断片を調製し、これを熱変性させたもの (dsHES) を使用した。

(1) 方法

10 (1-1) プラスミドおよびファージミド

pHygEGFP (CLONTECH Laboratories Inc., CA) の KpnI-SalI 断片を、pALTER-1 (Promega Corp., WI) の同じ制限酵素部位へ導入した pALHE 对し、Altered Sites II in vitro Mutagenesis System (Promega Corp., WI) を用いて部位特異的変異導入反応を行った。一回目の反応ではオリゴヌクレオチド Xho (5'-cggcaccccgagcacgcggat-3' : SEQ ID No. 1) を用いて XhoI 部位を導入した (pALHEX)。このときコドン 195 は Val から Glu へ変化するが、遺伝子修復反応の定量には影響しなかった。二回目の反応では、正常 HygEGFP 遺伝子のコドン 34 15 に遺伝子マーカーとなる PmaCI 部位を、オリゴヌクレオチド Silent (5'-gcgaagaatcacgtgtttca-3' : SEQ ID No. 2) を用いて導入した (pALHEXP)。

20 さらに pALHEXP に対し、コドン 34 に opal 変異を導入するために、オリゴヌクレオチド Opal (5'-ggcgaagaatgacgtgttttc-3' : SEQ ID No. 3) を用いた (pALHEXB)。最後の反応は opal 変異と同時に、先ほど導入された PmaCI 部位が除去され、代わりに変異型 HygEGFP 遺伝子のマーカーとして BmgBI 部位が導入される。それぞれの HygEGFP 遺伝子の配列はシークエンス反応によって確認した。pALHEXP および pALHEXB より BamHI-SalI 断片を精製し、NXB リンカー (Upper: 5'-catggcgatcctcga-3' : SEQ ID No. 4, Lower: 5'-gatctcgaggatcgc-3' : SEQ ID No. 5) を用いて、pTriEx-3Neo (Novagen, WI) の CMV プロモーターおよび T7 プロモーターの下流に存在する NcoI-XhoI 部位へ導入した (pTENHES,

pTENHES、図1 A)。ここで得られたプラスミドは、大腸菌および哺乳動物の両細胞内で、それぞれ正常型または変異型 HygEGFP 遺伝子を発現することができる事が確認された。これらのプラスミドを大腸菌 DH-5 α 株に導入し、Endofree Mega Kit (QIAGEN, CA) を用いて調製した。

- 5 ファージミドは、pTENHES の XhoI 断片を pBluescript II SK+ の XhoI 部位に導入することによって得られた (図1 B)。これによって得られる pBSHES/AntiSense および pBSHES/Sense は、それぞれ XhoI 断片の向きが pBluescript II SK+ (Stratagene, CA) の f1 ori に対し逆の向きに挿入され、このファージミドから得られる一本鎖環状 DNA は、それぞれ hHygEGFP 遺伝子のアンチセンス配列
10 またはセンス配列を含んでいる。それぞれの挿入方向は制限酵素 NaeI および PmaCI によって確認した。これらのファージミドを JM105 株に導入し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む 2×YT 培地で一晩培養した後、5ml を 500ml の 2×YT 培地 (50 μ g/ml Amp) に移し、激しく攪拌しながら 37°C で培養した。1 時間後に 25 μ g/ml となるようカナマイシンを加え、再び培養を続け、23 時間後、遠心分離 (2.15 \times 10³g、15 分) によってファージを大腸菌と分離した。上清に含まれる
15 ファージに、75ml の 20%PEG6000/2.5 M NaCl 溶液を加え、一晩 4°C に静置した。遠心分離 (18.8 \times 10³g、20 分) により、ファージを沈殿させた後、20ml の 0.3 M AcONa/1mM EDTA に懸濁し、フェノール、フェノール/クロロフォルム (1/1)、
20 クロロフォルムによって、環状一本鎖 DNA を回収した。DNA 溶液に 25ml EtOH を加え、室温に 15 分間静置した後、遠心分離によって沈殿させ、500 μ l の H₂O に溶解した。

(1-2) 断片の調製

- pTENHES 1 μ g 当たり 2.5 U の制限酵素 XhoI で消化し、606bp の断片を 3.5% 低融点アガロースゲルによって分離した後、フェノール・クロロフォルム抽出によって回収した。また一本鎖状の pBSHES/AntiSense および pBSHES/Sense 1pmol (1.1 μ g) に対し 5 U の XhoI を用い、二本鎖と同様の操作によって、606nt の断片を回収した。環状一本鎖 DNA の制限酵素処理では、XhoI 部位周辺を二本鎖とするため、pBSHES/AntiSense の 5' および 3' 側の XhoI 部位に相同的なオリゴヌク

レオチド AS5' (5'-ccccccctcgagatcccc-3' : SEQ ID No. 6) および AS3' (5'-cggcacctcgaggtcgac-3' : SEQ ID No. 7)、また pBSHES/Sense の 5' および 3' 側に対し S5' (5'-ccccccctcgaggtgccg-3' : SEQ ID No. 8) および S3' (5'-ggggctctcgaggtcgac-3' : SEQ ID No. 9) を、環状一本鎖に対し 5 モル当量、
5 制限反応溶液に加えた。

回収された断片は、それぞれゲルろ過 (NAP5 columns, Amersham Biosciences Ltd., Buckinghamshire, England) により精製を行い、精製度を A_{260}/A_{280} が 1.8 以上であることにより確認した。濃度は 1.0 OD₂₆₀ を、二本鎖 DNA では 50 μg 、一本鎖では 40 μg として算出した。

10 (1-3) 遺伝子導入

遺伝子導入反応の前日に、4ml の 10%FBS を含む D'MEM/F12 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 中に懸濁した 3×10^5 の CHO-K1 細胞を 6-cm ディッシュに播き、37°C、5%CO₂ 雰囲気下において培養した。あらかじめ熱変性処理 (98°C、5 分間 → 0°C、5 分間) させた 2.5、5、10 nmol (それぞれ 0.47、0.94、1.9 μg) の一本鎖 DNA
15 または 10 nmol (3.8 μg) の二本鎖 DNA に、72 μg の PLUS 試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を含む 149 μl の D'MEM/F12、および 25 fmol (125 ng) の pTENHEX を加えた。さらに、N/P 比の違いが遺伝子修復効率に大きな影響を及ぼすことが報告されている (Sangiulolo F, Bruscia E, Serafino A, Nardone AM, Bonifazi E, Lais M, Gruenert DC and Novelli G. In vitro correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique. BMC Med Genet. 2002;3:8) ため、すべてのサンプルにおいて DNA 量
20 が一定 (計 4 μg) となるよう、Amp 耐性遺伝子を含まない pALTER-Ex2 (Promega Corp., WI) を適量加えた。これを 20 分間室温に放置した後、32 μg の LipofectAMINE 試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を含む 141 μl の D'MEM
25 /F12 を加え、さらに 20 分間室温に放置し、細胞に処理する直前に 250 μl の D'MEM /F12 を加えた。細胞は 4 ml の D'MEM/F12 で洗った後、2 ml の D'MEM/F12 に置換し、そこへ先に調製した DNA 溶液を全量加え、37°C、5%CO₂ 雰囲気下においてインキュベートした。6 時間後、反応溶液を 4 ml の 10%FBS を含む D'MEM/F12

に置換し、導入反応を終了した。さらに 42 時間培養した細胞をトリプシン処理し、1ml PBS で洗った後、遠心分離により細胞を集めた。これを 100 μ l の TEG (25mM Tris-HCl、10mM EDTA、50mM Glc、pH8.0) に懸濁し、200 μ l の 0.2N NaOH／1% SDS を加え穏やかに攪拌した後、室温に 5 分間放置した。さらに 150 μ l の 8M AcONH₄ 5 を加え、4°Cで 15 分間冷やした。遠心分離後、isoPrOH 沈殿によって、上清からプラスミド DNA を回収した。プラスミド DNA は 20 μ l の H₂O に溶解し、-20°Cに保存した。

(1-4) 遺伝子修復効率の定量

前日から 1.4ml の LB 培地で培養した DH-5 α を、1 サンプル当たり 125 μ l と 10 り 12.5ml の新鮮な LB 培地へ移し、さらに 4 時間培養した。大腸菌は 7.5、1.0. 2ml の冷 H₂O で洗浄し、最後に約 100 μ l となるよう冷 H₂O を加え、再度懸濁させた。これを 4 μ l の pDNA と共に 0.1-cm ギャップのキュベットへ移し、Gene Pulser II (Bio-Rad laboratories inc. CA) を用いて、4°C、1.8kV、25 μ F、200 Ω の条件でエレクトロポレーションを行った。プラスミドを導入した DH-5 α は、1ml SOC 15 培地で 1 時間培養した後、50 μ g/ml Amp 添加 LB 培地に希釈し、一晩培養した。このとき DH-5 α の一部をとり、LB 寒天培地に播き、コロニー数によってエレクトロポレーション効率を測定したが、大きな違いは観察されなかった。翌日得られた DH-5 α を遠心分離によって回収し、100 μ l の TEG に再懸濁した。これに 200 μ l の 0.2N NaOH／1% SDS を加え穏やかに攪拌した後、さらに 150 μ l Sol III 20 (3M 酢酸カリウム、11.5% 酢酸) を加え、氷上に 5 分間放置した。遠心分離した上清をフェノール／クロロフォルム (1/1) で処理し、エタノール沈殿によりプラスミド DNA を回収した。これを 20 μ l の H₂O に溶解し、このうち 1-2 μ l を大腸菌 BL21 (DE3) 株へエレクトロポレーションにより導入した。このとき、DH-5 α と同様の操作によって、BL21 (DE3) への形質転換を行った。

25 形質転換後、1ml の SOC 培地を加え、37°Cで 1 時間培養した後、その 50 μ l をとり 50 μ g/ml Amp および 10 μ M IPTG を含む 1ml の LB 培地で 37°C、3 時間培養した。培養後、培地の一部を 1-10 倍希釈したものと 75 μ g/ml ハイグロマイシン B 添加 LB 寒天培地 (Hyg75 : 50 μ g/ml Amp, 10 μ M IPTG) へ、100-1000 倍希

釀したものを、ハイグロマイシンBを含まないLB寒天培地(Hyg0:50 μg/ml Amp、
10 μM IPTG)へ、それぞれ等量ずつ播き、37°Cでインキュベートした。12–24
時間後、Hyg0に生えたコロニーを数え、また、26–48時間後に Hyg75に生えた
コロニーは、FLA2000G (FUJI PHOTO FILM Co., Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて
5 解析し、EGFPの蛍光(Ex. 473nm、Em. 520nm)を発するコロニーを数えた。Hyg0
で得られたコロニー数を分母に、Hyg75で得られたEGFPの蛍光陽性コロニー数を
分子とすることで遺伝子修復効率を算出した。

(1-5) 遺伝子型の確認

Hyg75 プレート上に得られた EGFP 陽性コロニーをいくつか選び、その一部を
10 20 μl の H₂O に懸濁した後、98°Cで5分間、熱処理を行った。細菌の不溶性成分
を遠心分離によりペレットとし、上清 2 μl を鋳型として、rTaq DNA polymerase
(TOYOB0 Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて PCRを行った。このときプライマー
として、T7pro (5'-taatacgactcaatatagg-3' : SEQ ID No. 10) および HET7
(5'-atcgccctcgctccaggtaat-3' : SEQ ID No. 11) を用いた。ここで得られた PCR
15 産物は、さらに正常型 HygEGFP 遺伝子マーカーである PmaCI 処理および ABI PRISM
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City,
CA) を用いたシークエンシング反応に用いた。

(2) 結果

(2-1) 遺伝子修復反応の評価系

20 pTENHES および pTENHEX (図 1 A) は、それぞれ正常型、変異型 HygEGFP 遺伝
子が組み込まれており、それぞれのコドン 34 は Ser (TCA : PmaCI)、Stop (TGA :
BmgBI) である。また、一本鎖を作成するためのファージミドベクター pBSHES／
AntiSense および pBSHES／Sense (図 1 B) は、pTENHES を XhoI 処理して得られ
た正常 HygEGFP 遺伝子の一部が組み込まれており、環状一本鎖となったとき、そ
れぞれアンチセンス配列およびセンス配列をコードする。

pTENHES および一本鎖環状 pBSHES／AntiSense、pBSHES／Sense を XhoI 処理
して得られた DNA 断片を、今後それぞれ dsHES、f AntiS、f Sense と記載する。
標的プラスミド pTENHEX は、dsHES、f AntiS、f Sense と共に CHO-K1 細胞へ導入

した。このプラスミドには、哺乳動物細胞での発現のための CMV プロモーターおよび大腸菌内での発現のための T7 プロモーターによって、変異型 HygEGFP 遺伝子が支配されているため、修復反応が成功したとき両細胞から EGFP の蛍光が観察される（図 2）。さらに、ハイグロマイシン B に耐性となるため、修復された遺伝子を容易に単離することができる（図 3）。

5 (2-2) 遺伝子修復反応

CHO-K1 細胞に、XbaI 処理して得られた DNA 断片と共に、標的である pTENHEX を導入した。このとき、dsHES は二本鎖であるため、これまでの SFHR 法と同様、細胞へ導入する直前に熱変性した。また fAntiS および fSense は一本鎖 DNA ではあるが、分子内高次構造を解き、また dsHES と比較を行うために、dsHES と同様に熱変性処理を行い細胞内へ導入した。導入開始から 48 時間後に細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、CHO-K1 細胞内で修復された HygEGFP 遺伝子が発現しているのが観察された（図 2）。これらの細胞よりプラスミドを回収し、BL21 (DE3) へ形質転換することにより得られるハイグロマイシン B 耐性かつ EGFP 陽性のコロニー（図 3）を確認し、遺伝子修復効率を算出した。pTENHEX に対し 400 倍のモル比に相当する 10nmol の DNA 断片を処理したとき、二本鎖 DNA 断片である dsHES では、0.43% といった従来の SFHR 法と同等の修復効率であった（図 4）。これに対し、一本鎖 DNA 断片である fAntiS は、dsHES を越える遺伝子修復効率は示さなかったものの（0.15%）、fSense を処理した場合、2.0% という、dsHES 20 に対して約 5 倍高い遺伝子修復効率を示した（図 4）。

この解析によって得られた EGFP 陽性コロニーをいくつか選び、その遺伝子配列を制限酵素 PmaCI（図 5）およびシーケンシング反応（図 6）によって確認した。その結果、コドン 34 における Stop から Ser (TGA→TCA) への配列変換が確認された。また、その他の配列変換は観察されなかったことより、この方法に 25 おける配列特異性が確認された。

比較例

実施例で使用した pTENHEX（コドン 34 に終止変異（Stop: TGA）を導入した

HygEGFP 遺伝子を保有するプラスミド DNA) に対して、PCR 産物を用いた従来の SFHR 法を行い、変異 HygEGFP 遺伝子の修復効率を実施例と同様に検討した。

PCR 産物 (pcrHES) は、以下のプライマー 1 と Taq ポリメラーゼ (Toyobo 社製) を用いて増幅し、3'-末端を Blunting High Kit (Toyobo 社製) により平滑末端化し、実施例の dsHES と同様にして 3.5% 低融点アガロース電気泳動により生成した。

- ・プライマー 1 : 5'-gagatccccggagccg-3' (SEQ ID No. 10)
- ・プライマー 2 : 5'-gaggtgccggacttcgg-3' (SEQ ID No. 11)

結果は、図 3 および図 4 に示したとおりである。PCR 産物 (pcrHES) は、一本鎖センス DNA 断片 (fSense) と比較して細胞のハイグロマイシン B 耐性形質の獲得効果が低く (図 3)、変換効率は 0.16% であった。この値は dsHES の変換効率 (0.43%) の半分以下であり、また、一本鎖センス DNA 断片 (fSense) の変換効率 (2.0%) の 10 分の 1 以下であった。

15

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、細胞内 DNA 配列の特定塩基または塩基配列を高効率で他の塩基、または、塩基配列に変換する方法が提供される。これによって、疾患遺伝子等の変異箇所を効率よく修復することが可能となる。

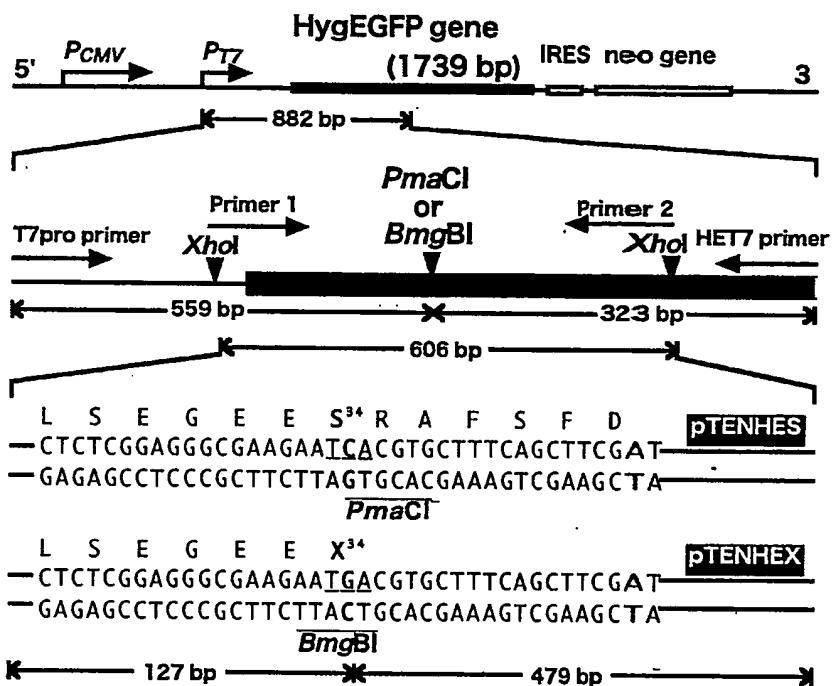
20

請求の範囲

1. 細胞内の標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基を変換する方法であって、標的 DNA 配列と相同であり、かつ、変換すべき塩基を含む、一本鎖環状 DNA から調製される 300～3,000 塩基の一本鎖 DNA 断片を細胞内に導入することを特徴とする DNA 配列の塩基変換方法。
2. 一本鎖環状 DNA が、ファージミド DNA である請求項 1 の方法。
3. 一本鎖 DNA 断片が、標的 DNA 配列のセンス鎖と相同である請求項 1 または 2 の方法。
4. 細胞内の標的 DNA 配列が、その 1 または複数個の塩基によって疾患の原因となっている DNA 配列である請求項 1 から 3 のいずれかの方法。
5. 生物体内細胞の標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基を変換する請求項 1 から 4 のいずれかの方法。
6. 請求項 1 から 5 のいずれかの方法によって、標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基が変換された細胞。
7. 請求項 6 の細胞を体内に保有する生物個体。
8. 標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基の変換が原因となっている疾患を治療するための薬剤であって、標的 DNA 配列に相補的であり、かつ、変換すべき塩基を含む、一本鎖環状 DNA から調製される 300～3,000 塩基の一本鎖 DNA 断片が細胞内に導入可能な形態を有することを特徴とする治療薬剤。
9. 一本鎖環状 DNA が、ファージミド DNA である請求項 8 の治療薬剤。
10. 標的 DNA 配列の 1 または複数個の塩基の変換が原因となっている疾患を治療する方法であって、標的 DNA 配列に相補的であり、かつ、変換すべき塩基を含む、一本鎖環状 DNA から調製される 300～3,000 塩基の一本鎖 DNA 断片を細胞内に導入することを特徴とする治療方法。
11. 一本鎖環状 DNA が、ファージミド DNA である請求項 10 の治療方法。

図 1

A.



B.

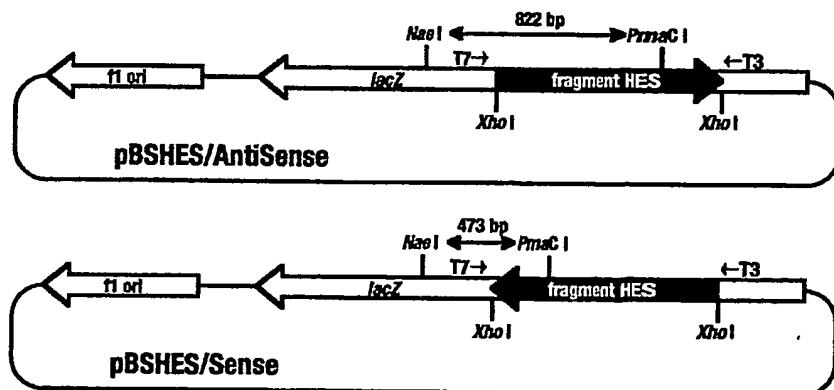


図 2

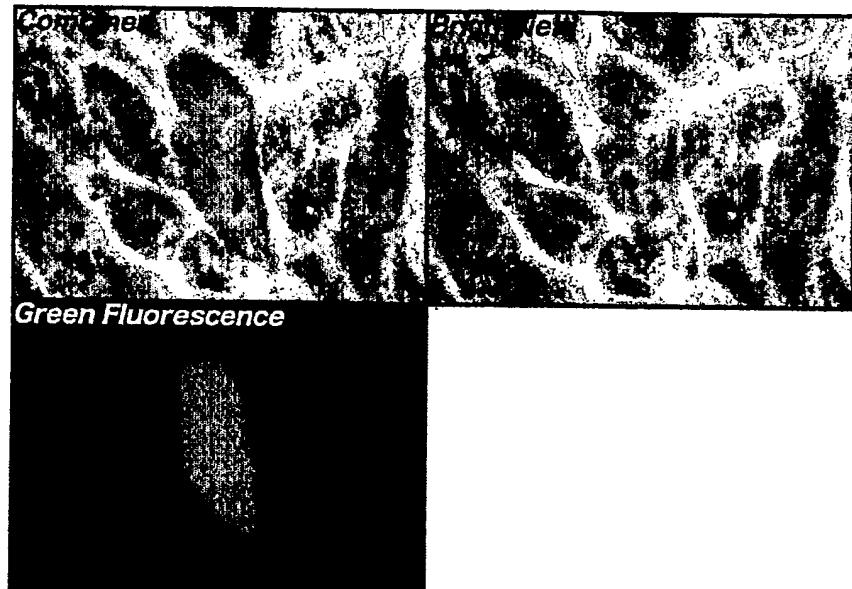


図 3

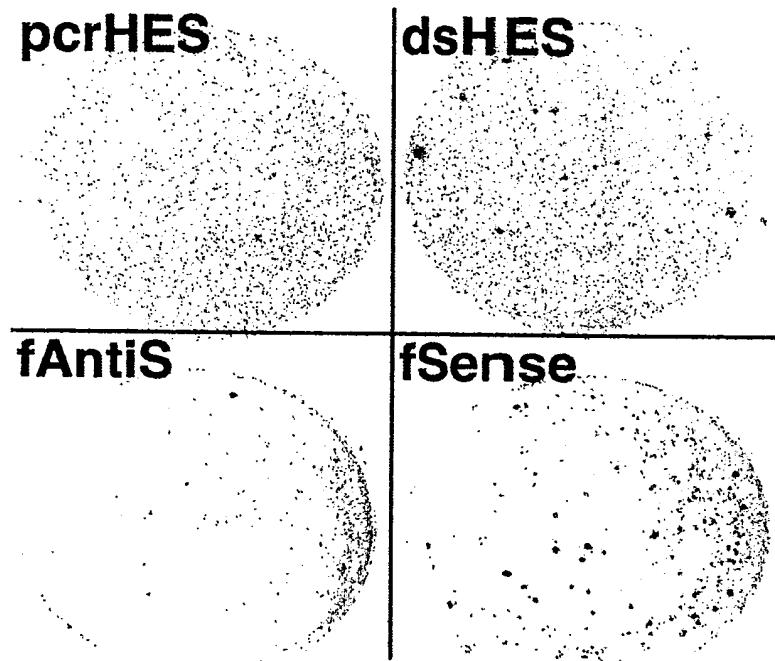


図 4

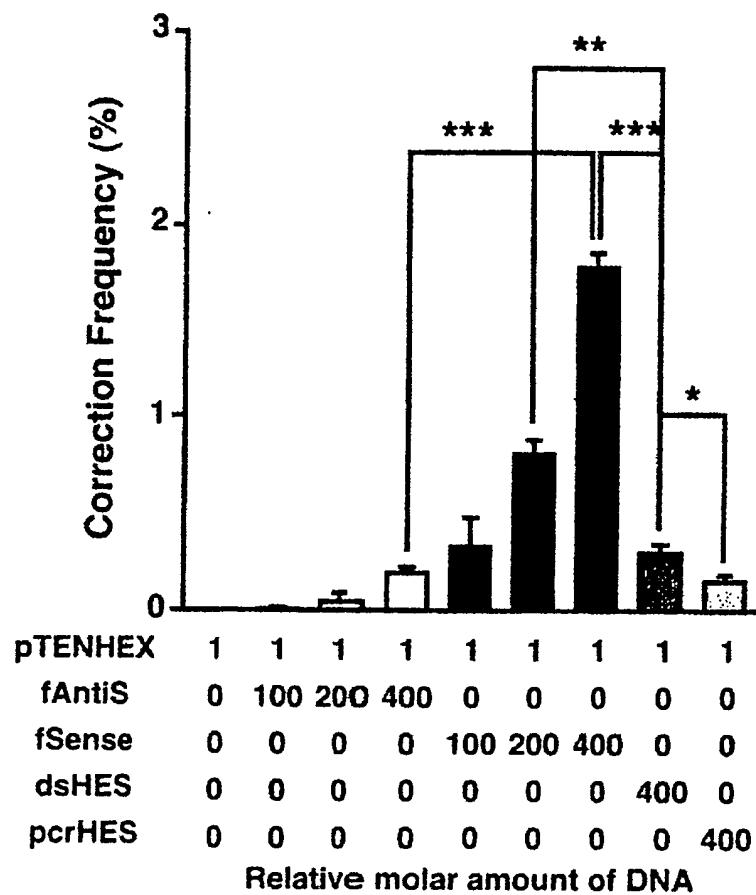


図 5

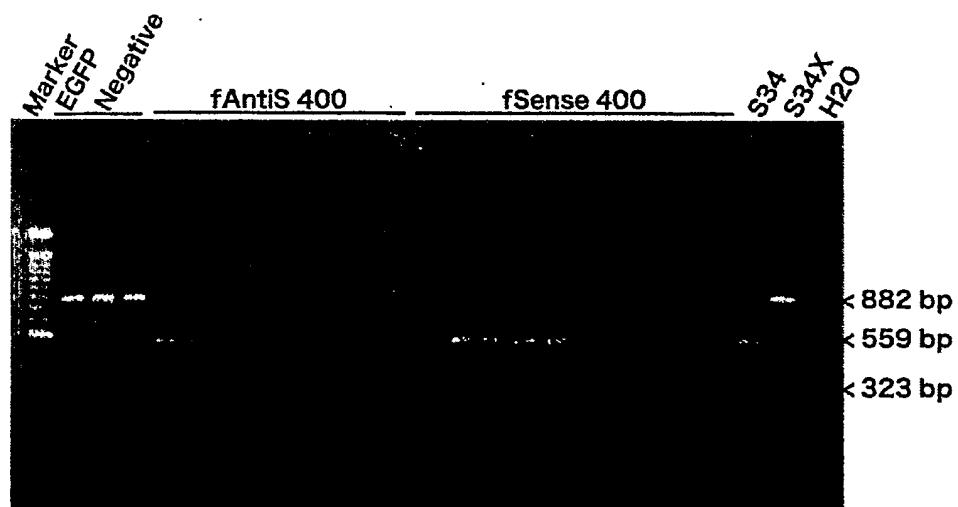
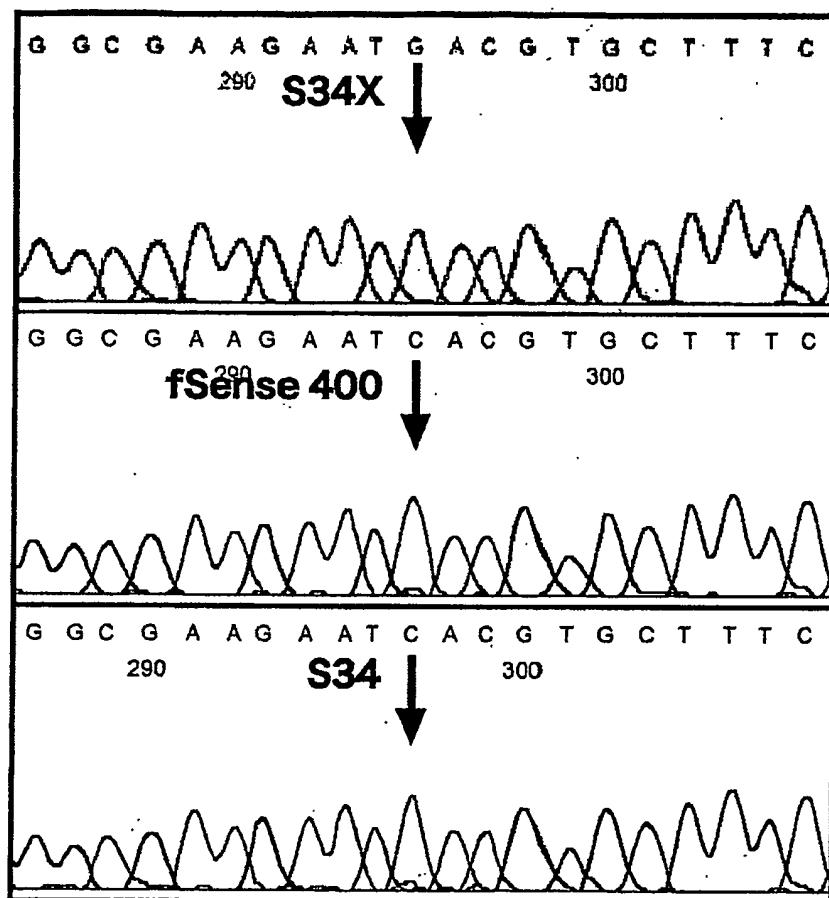


図 6



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> A Method of Base Modification for DNA Sequence

<130> 05F003PCT

<150> JP 2004-34019

<151> 2004-02-10

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

cggcacctcg agcacgcgga t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gcgaagaatc acgtgctttc a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

ggcgaagaat gacgtgcttt c

21

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

catggcgatc ctgcga

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificialia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gatctcgagg atcgc

15

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificialia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

ccccccatcgatcccc

17

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Articia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7

cggcacctcg aggtcgac

18

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Articia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8

ccccccctcga ggtgcgg

17

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Articia

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9

ggggctctcg aggtcgac

18

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10

gagatccccg gagccg

16

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 11

gagggtgccgg acttcgg

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int .C1⁷ C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int .C1⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST FILE(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 6010908 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 04 January, 2000 (04.01.00), Columns 7 to 12; examples 11, 18, 19 & WO 97/13869 A1 & AU 7262696 A & US 5804383 A	1, 4-8 2, 9
X Y	US 2002/0160514 A1 (GONCZ, Kaarin Kerr), 31 October, 2002 (31.10.02), Table 1; Par. Nos. [0050], [0055] to [0058], [0116] to [0122], [0164] to [0179] (Family: none)	1, 4-8 2, 9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 March, 2005 (04.03.05)Date of mailing of the international search report
22 March, 2005 (22.03.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001991

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONCZ et al., Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments, Hum. Mol.Genet., 1998, Vol.7, No.12, pages 1913 to 1919	1, 4-8 2, 9
X	COLOSIMO et al., Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments, Mol.Ther., February 2001, Vol.3, No.2, pages 178 to 185	1, 4-8 2, 9
Y	LING & ROBINSON, Approaches to DNA Mutagenesis: An Overview, Anal.Biochem., 1997, Vol.254, pages 157 to 178	2, 9
A	GRUENERT et al., Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments, J.Clin.Invest., September 2003, Vol.112, No.5, pages 637 to 641	1-9
A	KOWALCZYKOWSKI, Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication, Trends Biochem.Sci., April 2000, Vol.25, pages 156 to 165	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001991

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 10 - 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10 to 11 are relevant to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl. 7 C12N 15/87

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl. 7 C12N 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 6010908 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 20	1, 4-8
Y	00.01.04, 第7~12カラム, Example 11, 18, and 19 & WO 97/13869 A1 & AU 7262696 A & US 5804383 A	2, 9
X	US 2002/0160514 A1 (GONCZ, Kaarin Kerr) 2002.10.31, Table 1,	1, 4-8
Y	【0050】 , 【0055】 ~ 【0058】 , 【0116】 ~ 【0122】 , 【0164】 ~ 【0179】 (ファミリーなし)	2, 9
X	GONCZ et al., Targeted replacement of normal and mutant CFTR	1, 4-8
Y	sequences in human airway epithelial cells using DNA fragme	2, 9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.03.2005

国際調査報告の発送日

22.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

内田 俊生

4B 3538

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	nts, Hum. Mol. Genet., 1998, Vol. 7, No. 12, p. 1913-1919.	1, 4-8
Y	COLOSIMO et al., Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments, Mol. Ther., February 2001, Vol. 3, No. 2, p. 178-185.	2, 9
Y	LING & ROBINSON, Approaches to DNA Mutagenesis: An Overview, Anal. Biochem., 1997, Vol. 254, p. 157-178.	2, 9
A	GRUENERT et al., Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments, J. Clin. Invest., September 2003, Vol. 112, No. 5, p. 637-641.	1-9
A	KOWALCZYKOWSKI, Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication, Trends Biochem. Sci., April 2000, Vol. 25, p. 156-165.	1-9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 10-11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 10-11 は、人の身体の治療による処置方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.